

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



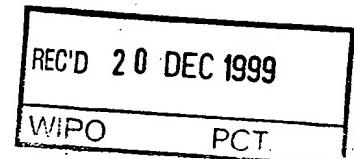
4

FR99/2826

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

**COPIE OFFICIELLE**



Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le ..... **08 DEC. 1999** .....

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Martine Planche". It is written in a cursive style with some loops and variations in thickness.

Martine PLANCHE

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIETE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04

réponse immunitaire spécifique ou non-spécifique, telles que les lymphocytes et les macrophages, et une sécrétion accrue d'immunoglobulines [PERDIGÓN et al. Int. J. Immunother. 9, 29-52, (1993) ; PORTIER et al., Int. J. Immunother. 9, 217-224 (1993) ; SOLIS PEREYRA et LEMONNIER, Nutr. Research 13, 1127-1140 (1993)] ; DE SIMONE et al., Int. J. Immunother. 9, 23-28 20 (1993) ; PERDIGON et al. J. Dairy Res. 61, 553-562 (1994) ; SCHIFFRIN et al. J. Dairy Sci. 78, 491-497 (1995)].

Cependant, il apparaît que les effets bénéfiques induits par les bactéries lactiques peuvent varier selon l'origine de la pathologie concernée, l'espèce et/ou la souche bactérienne utilisée, et les conditions d'administration. Pour mieux adapter l'utilisation de ces bactéries, ou des produits les contenant, dans le cadre du traitement ou de la prévention de pathologies spécifiques, et pour être en mesure de sélectionner les bactéries les plus appropriées à l'utilisation souhaitée, il est donc nécessaire de mieux connaître les mécanismes par lesquels s'exercent leurs effets.

Les Inventeurs ont entrepris d'étudier l'effet sur la muqueuse intestinale de bactéries lactiques du groupe *Lactobacillus casei* ; ils ont choisi dans ce but la souche de *L. casei* DN 114001. Cette souche est décrite dans la Demande PCT WO 96/20607 au nom de : COMPAGNIE GERVAIS DANONE, et a été déposée le 30 décembre 1994, auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) tenue par l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, à Paris, sous le numéro I-1518, et ses propriétés bénéfiques dans le cadre du traitement des diarrhées ont été montrées.

Les inventeurs ont étudié l'effet *in vitro* de cette souche de *L. casei* sur la production de médiateurs de l'immunité non-spécifique (cytokines pro-

inflammatoires et oxyde nitrique) par des entérocytes en culture.

Ces lignées de cellules, qui sont issues de l'épithélium intestinal humain, constituent un modèle d'étude de la réponse de celui-ci à une agression, infectieuse ou autre. Cette réponse se manifeste notamment par la production de cytokines pro-inflammatoires (principalement IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), et d'oxyde nitrique (NO), généré par une isoforme inducible de la NO synthase (iNOS). L'oxyde nitrique participe, par ses propriétés antimicrobiennes, à la défense contre les microorganismes pathogènes, et lorsqu'il est produit en faible quantité, à la protection de la muqueuse intestinale. Cependant, à forte dose, il diminue la viabilité des cellules épithéliales, et contribue à l'instauration et à l'entretien d'un état inflammatoire chronique [ALICAN et KUBES, Am. J. Physiol. 270, G225-237, (1996) ; TEPPERMAN et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 271, 1477-1482, (1994)]. La production de NO par les entérocytes en culture peut être induite par les cytokines pro-inflammatoires [VALETTE et al., Br. J. Pharmacol., 121, 187-182 (1997) ; KOLIOS et al., Br. J. Pharmacol., 116, 2866-2872 (1995)], ainsi que par les toxines lipopolysaccharidiques (LPS) de certaines bactéries à gram négatif (TEPPERMAN et al., 1994, publication précitée). Des travaux récents [SALZMAN et al. Gastroenterology, 114, 93-102, (1998) ; WITTHOFT et al., Am. J. Physiol., 275, G564-571, (1998)] indiquent que les bactéries entéropathogènes *Escherichia coli*, *Salmonella dublin*, *Shigella flexneri*, induisent l'expression de l'iNOS et la production de NO dans des cultures d'entérocytes, pré-activées ou non par des cytokines pro-inflammatoires.

Les inventeurs ont maintenant constaté que, dans le cas de leurs expérimentations avec *L. casei*, l'action sur la production de cytokines pro-

inflammatoires et de NO variait selon l'état d'activation des entérocytes. En effet, lorsque les cellules sont dans leur état basal, on n'observe aucun effet de *L. casei* ; lorsqu'elles sont activées par l'addition de cytokines pro-inflammatoires (ce qui reproduit les conditions d'une agression, infectieuse ou autre), on observe une faible production de NO et de TNF ; cette réponse à l'agression est très significativement augmentée par l'addition de *L. casei*. Enfin, dans le cas de cellules hyperactivées par l'addition de cytokines inflammatoires et de LPS (ce qui reproduit les conditions d'un état inflammatoire pathogène), on observe au contraire une diminution de la production de NO et de TNF, qui est ramenée à un niveau optimal.

Il apparaît donc que cette souche de *L. casei* favorise une réponse adaptative des cellules à une agression, par l'intermédiaire de la modulation de facteurs intervenant dans l'immunité non-spécifique.

La mise en évidence de ces propriétés permet de proposer l'utilisation de la souche CNCM I-1518 de *L. casei*, et/ou de toute autre souche de bactérie lactique capable de diminuer la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires et des LPS bactériens, pour l'obtention de compositions régulatrices de la réponse inflammatoire des entérocytes, et en particulier inhibitrices d'une réponse inflammatoire pathogène.

Avantageusement, on utilisera une souche capable en outre d'augmenter la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires.

Les compositions obtenues sont utilisables pour la prévention ou le traitement de pathologies inflammatoires aiguës ou chroniques de l'intestin (colites, entérites, maladie de Crohn, rectocolites hémorragiques, etc.), que ces pathologies soient

d'origine infectieuse (induites par des bactéries, des virus, des levures, etc.) ou non ; elles sont particulièrement appropriées dans le cadre du traitement des états inflammatoires chroniques.

5 Conformément à l'invention, les bactéries lactiques peuvent être utilisées sous forme de bactéries entières vivantes ou non, sous forme de lysat bactérien, ou sous forme de fractions bactériennes ; les fractions bactériennes convenant à cette utilisation peuvent être 10 choisies en testant leurs propriétés d'augmentation de la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires, et de diminution de la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires et des LPS bactériens.

Préférentiellement, ces compositions peuvent être administrées sous forme de compléments alimentaires. Il peut s'agir notamment de produits laitiers fermentés ; dans ce cas, les bactéries lactiques utilisées, 20 conformément à l'invention, pour l'obtention de ces compositions peuvent faire partie du ferment mis en œuvre pour l'obtention de ces produits laitiers.

On peut notamment utiliser des bactéries lactiques choisies parmi les lactobacilles, les 25 lactocoques, les streptocoques et les bifidobactéries. Avantageusement, on utilise une souche de *L. casei*, et de préférence, la souche CNCM I-1518.

De nouvelles souches de bactéries lactiques dotées de propriétés modulatrices de l'immunité non-spécifique, et utilisables notamment pour l'obtention de 30 compositions régulatrices de la réponse inflammatoire des entérocytes, peuvent être obtenues par la mise en œuvre d'un procédé de criblage comprenant la sélection de souches de bactéries lactiques capables de diminuer la 35 production de NO par des cultures d'entérocytes

ou par le CYTOMIX+LPS (●), ou par les cellules HT-29 préactivées par le CYTOMIX seul (□) ou par le CYTOMIX+LPS (■), en présence de quantités croissantes d'extrait total de la souche CNCM I-1518.

5 EXEMPLE 1 : EFFET DE *L. CASEI* SUR LA PRODUCTION D'OXYDE NITRIQUE PAR LES LIGNÉES DE CELLULES ÉPITHÉLIALES DU COLON.

Chacune des 2 lignées a été ensemencée à  $2 \times 10^5$  cellules/puits en plaques de 96 puits, en milieu DMEM supplémenté de 5% de SVF, de 100 U/ml de pénicilline, de 100 µg/ml de streptomycine et de 2 mM de L-glutamine.

Les cellules sont pré-incubées pendant 24 heures à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, en présence de CYTOMIX (mélange IL-1β : 10 ng/ml, TNF-α : 25 ng/ml, IFN-γ : 10<sup>3</sup> U/ml). Les cellules sont ensuite incubées pendant 24 heures supplémentaires en présence ou non de quantités croissantes d'extraits totaux de *L. casei* (en % vol/vol).

Après l'incubation, les surnageants de culture sont récupérés et congelés avant la détermination de la concentration en nitrites. Pour certaines expériences, du L-NAME (1 mM), qui est un analogue de la L-arginine et constitue un inhibiteur compétitif spécifique des NO-synthases est ajouté en même temps que les extraits de *L. casei*.

La quantité de NO produit est évaluée par le dosage dans les surnageants de culture, des dérivés stables de ce radical après sa réaction en milieu aqueux: les nitrites et les nitrates. Les nitrates sont dans un premier temps réduits en nitrites par des bactéries exprimant la nitrate-réductase et les nitrites sont ensuite dosés par la méthode de GRIESS. A 100 µl de surnageant on ajoute 100 µl d'une solution composée de 1 volume d'une solution de sulfanilamide à 1% dans l'acide acétique à 30%, et de 1 volume d'une solution de dichlorhydrate de N-1-naphtyl éthylènediamine à 0,1% dans l'acide acétique à 60%. Une courbe de calibration

standard est réalisée en présence de différentes concentrations de nitrite de sodium dilué dans du milieu de culture (DMEM 5%SVF). Les absorbances sont ensuite déterminées à 540 nm en utilisant un lecteur MULTISCAN  
5 MCC340, (LABSYSTEM)

La figure 1 montre qu'en présence du CYTOMIX seul, on n'observe qu'une production limitée de NO par les lignées HT-29 et Caco-2 ; cette production est augmentée de façon dose-dépendante par l'addition de  
10 l'extrait de *L. casei*. Un effet maximal est observé pour une concentration d'environ 3% (v/v) d'extrait de *L. casei*. En l'absence de CYTOMIX, *L. casei* n'a pas d'effet sur la production de NO par l'une ou l'autre des lignées.

La figure 2 montre que cette production induite par le CYTOMIX est inhibée par l'addition de L-NAME, en présence ou non d'extrait total de *L. casei* (3% v/v).

**EXEMPLE 2 : EFFET DE *L. CASEI* SUR LA PRODUCTION DE TNF- $\alpha$  PAR LES LIGNÉES DE CELLULES ÉPITHÉLIALES DU COLON.**

20 Chacune des 2 lignées a été ensemencée à  $2 \times 10^6$  cellules/puits en plaques de 24 puits, en milieu DMEM supplémenté de 5% de SVF, de 100 U/ml de pénicilline, de 100  $\mu$ g/ml de streptomycine et de 2 mM de L-glutamine. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24 heures en  
25 présence de CYTOMIX, puis pendant 24 heures supplémentaires en présence des extraits totaux de *L. casei*. Pour certaines expériences, du L-NAME (1 mM) ou un inhibiteur de la voie de transduction NF $\kappa$ B (le PDTC: 10 pM) sont ajoutés en même temps que les extraits  
30 bactériens.

Les surnageants de culture sont ensuite récupérés et leur concentration en cytokines déterminées par ELISA.

La figure 3 montre qu'en présence du CYTOMIX  
35 seul, il n'y a qu'une faible production de TNF- $\alpha$  par la lignée Caco-2, et une absence de production de cette

cytokine par la lignée HT-29. Cette production est fortement augmentée, pour les deux lignées, par l'addition d'extrait total de *L. casei*; elle est inhibée par l'addition de L-NAME ou de PDTC, ce qui montre que 5 l'activation de la production de cytokines pro-inflammatoires par *L. casei* fait intervenir la production de NO et l'activation de NF $\kappa$ B.

Les résultats présentés dans le tableau I ci-après montrent que l'addition de *L. casei* aux cellules 10 préactivées par le CYTOMIX active également la production d'IL-1 $\beta$ .

TABLEAU I

| Cellule | Préactivation | Stimulation | IL1- $\beta$ (pg/ml) | TNF- $\alpha$ (pg/ml) |
|---------|---------------|-------------|----------------------|-----------------------|
| Caco-2  | Aucune        | Aucune      | ND                   | ND                    |
| Caco-2  | CYTOMIX       | Aucune      | 150±15               | 75±11                 |
| Caco-2  | Aucune        | CNCM I-1518 | 95±8                 | ND                    |
| Caco-2  | CYTOMIX       | CNCM I-1518 | 1254±55              | 975±85                |
| HT-29   | Aucune        | Aucune      | ND                   | ND                    |
| HT-29   | CYTOMIX       | Aucune      | ND                   | ND                    |
| HT-29   | Aucune        | CNCM I-1518 | ND                   | ND                    |
| HT-29   | CYTOMIX       | CNCM I-1518 | 908±63               | 789±45                |

ND : NON DÉTERMINÉ

EXEMPLE 3 : EFFET DE *L. CASEI* EN PRÉSENCE DE LPS DE 15 BACTÉRIES GRAM-, SUR LA PRODUCTION D'OXYDE NITRIQUE PAR LES LIGNÉES DE CELLULES ÉPITHÉLIALES DU COLON PRÉ-ACTIVÉES PAR DES CYTOKINES PROINFLAMMATOIRES.

Le protocole est identique à celui de l'exemple 1 ci-dessus, à ceci près que 10  $\mu$ g/ml de LPS 20 d'*E. coli* sont ajoutés lors de l'incubation avec l'extrait total de *L. casei*.

Les résultats sont illustrés par la figure 4, qui montre une production importante de NO en l'absence de *L. casei* (cellules stimulées par CYTOMIX + LPS), qui 25 diminue en présence de quantités croissantes de *L. casei*,

jusqu'à revenir au niveau de celle des cellules activées par les cytokines seules.

## REVENDICATIONS

- 1) Utilisation d'une souche de bactérie lactique capable de diminuer la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires et des LPS bactériens, pour l'obtention d'une composition régulatrice de la réponse inflammatoire des entérocytes.
  - 2) Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que ladite souche est en outre capable d'augmenter la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires
  - 3) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite souche bactérienne est une souche de *L. casei*.
  - 4) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ladite souche bactérienne est la souche de *L. casei* CNCM I-1518.
  - 5) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ladite composition est sous la forme d'un complément alimentaire.
  - 6) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite composition est sous la forme d'un produit laitier fermenté.
- (7) Procédé de criblage de nouvelles souches de bactéries lactiques dotées de propriétés modulatrices de l'immunité non-spécifique, caractérisé en ce qu'il comprend la sélection de souches de bactéries lactiques capables d'inhiber la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires et des LPS bactériens.
- 8) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de sélection des souches capables d'augmenter la production

de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires, et optionnellement, une étape de sélection des souches n'exerçant aucun effet sur la production de NO par des entérocytes non-activés.

5           9) Procédé selon une quelconque des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que lesdites souches sont ciblées à partir de cultures de bactéries lactiques choisies dans le groupe constitué par les lactobacilles, les lactocoques, les streptocoques et les  
10 bifidobactéries.

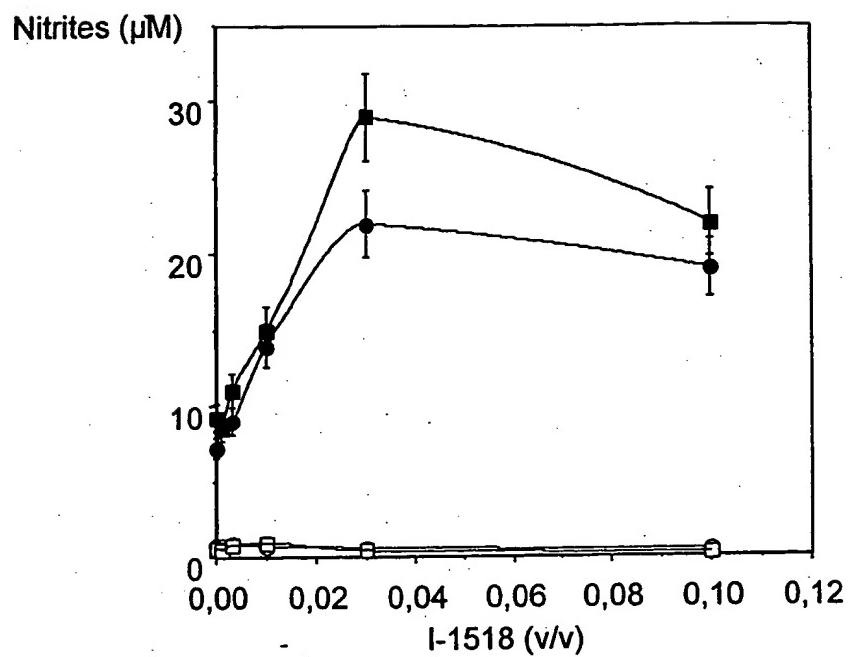


FIG. 1.

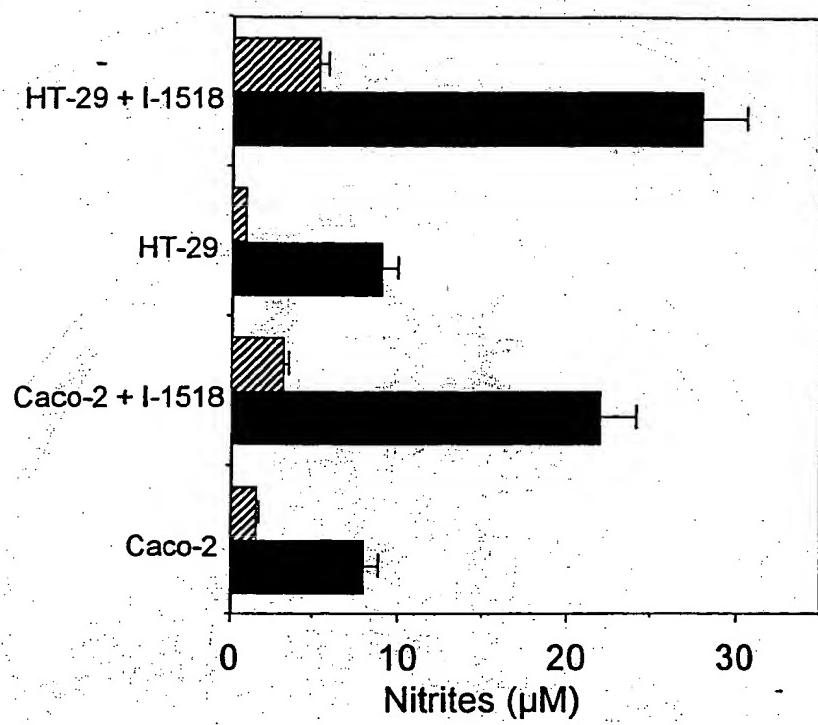


FIG. 2.

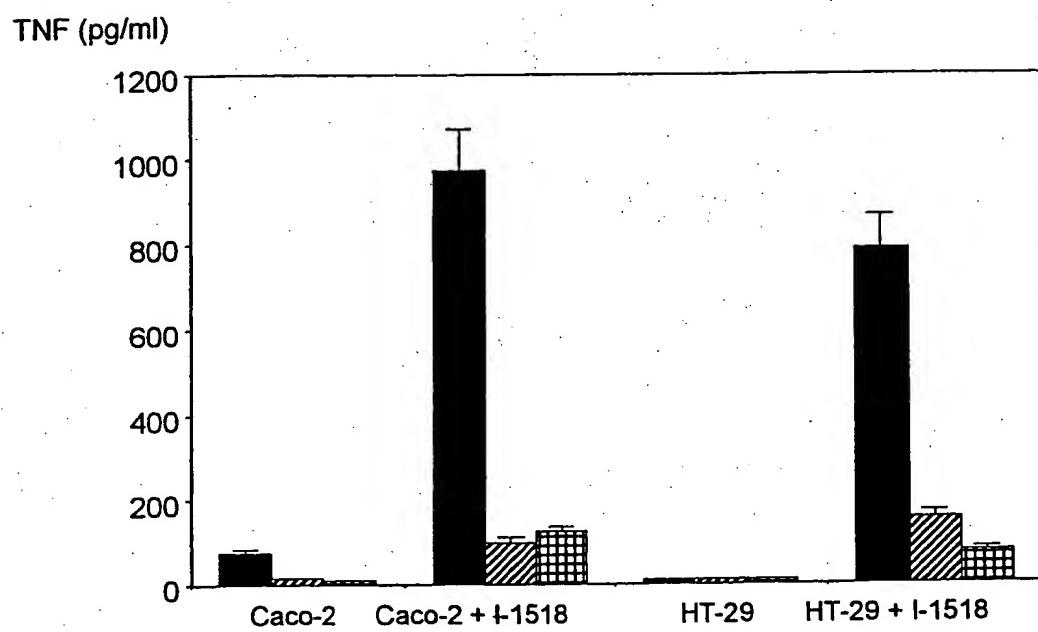


FIG. 3.

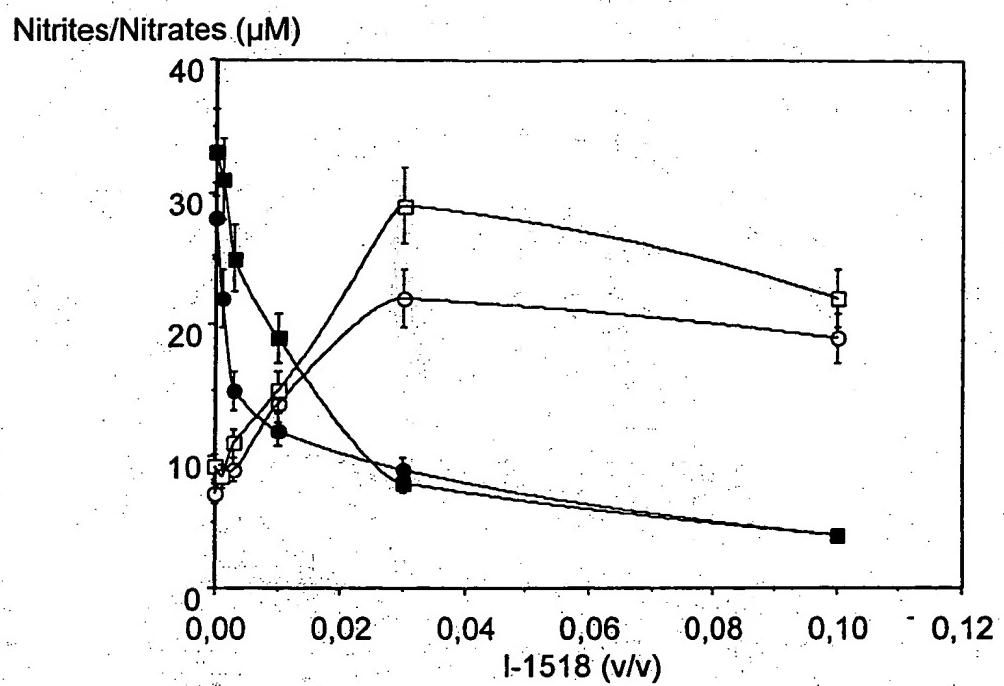


FIG. 4.